

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

11

(11)Publication number : 10-010065

(43)Date of publication of application : 16.01.1998

(51)Int.Cl. G01N 27/02  
G01N 27/327  
G01N 33/53  
G01N 33/543

(21)Application number : 08-181359

(71)Applicant : SHOWA SHELL SEKIYU KK

(22)Date of filing : 21.06.1996

(72)Inventor : SHIGENO TOSHIYA  
OYAMA HARUO  
HOZUMI TOYOJI

## (54) IMMUNOSENSOR

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To inexpensively and simply detect an antibodyantigen reaction by measuring the electric change between antibody immobilized electrodes or between antigen immobilized electrodes accompanying the antibody-antigen reaction by use of a general measuring instrument.

SOLUTION: The electrodes of a pair of antibody immobilized electrodes or antigen immobilized electrodes are electrically connected to each other by a protein layer containing antibody or antigen to constitute an electrode part. In the electrode part, two antibody immobilized electrodes are used when a subject is antigen, and two antigen immobilized electrodes when the subject is antibody. As the antibody of the antibody immobilized electrode, each of monoclonal antibody and polyclonal antibody, if it has a property of specifically recognizing antigen, can be used. As the method of immobilizing the antibody and antigen to the electrode surface, immobilization by adsorption and chemical bonding to electrode surface are given. The protein layer containing the antibody or antigen between the electrodes preferably has a conductivity of 10-5-105-6S/cm. For measurement of electric change of the electrode part, a general conductimeter can be used.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 26.05.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 08.02.2005

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-10065

(43) 公開日 平成10年(1998) 1月16日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 27/02			G 0 1 N 27/02	D
27/327			33/53	G
33/53			33/543	5 9 3
33/543	5 9 3		27/30	3 5 7

審査請求 未請求 請求項の数 5 F D (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平8-181359

(22) 出願日 平成8年(1996) 6月21日

(71) 出願人 000186913

昭和シェル石油株式会社

東京都港区台場二丁目3番2号

(72) 発明者 茂野 俊也

東京都千代田区霞が関3丁目2番5号 昭

和シェル石油株式会社内

(72) 発明者 大山 晴生

東京都千代田区霞が関3丁目2番5号 昭

和シェル石油株式会社内

(72) 発明者 穂積 豊治

東京都千代田区霞が関3丁目2番5号 昭

和シェル石油株式会社内

(74) 代理人 弁理士 友松 英爾 (外1名)

(54) 【発明の名称】 イムノセンサ

(57) 【要約】

【課題】 抗体抗原反応を抗体固定化電極上であるいは抗原固定化電極上で行わせ、その反応の有無あるいは進行の程度を抗体抗原反応に伴う抗体固定化電極間のあるいは抗原固定化電極間の電気的性質の変化として測定できる、安価で操作が簡単なイムノセンサの提供。

【解決手段】 (A) 表面に抗体あるいは抗原を固定した1対の抗体固定化電極あるいは抗原固定化電極を有し、該抗体固定化電極あるいは抗原固定化電極の間には抗体あるいは抗原を含むタンパク質層によって電気的に結合している電極部および (B) これら電極間の電気的性質を測定する計測器から構成されていることを特徴とするイムノセンサ。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (A) 表面に抗体あるいは抗原を固定した1対の抗体固定化電極あるいは抗原固定化電極を有し、該抗体固定化電極あるいは抗原固定化電極の間には抗体あるいは抗原を含むタンパク質層によって電氣的に結合している電極部および (B) これら電極間の電氣的性質を測定する計測器から構成されていることを特徴とするイムノセンサ。

【請求項2】 前記抗体あるいは抗原を含むタンパク質層が  $10^{-4}$  S/cm 以下の導電率を示すものである請求項1記載のイムノセンサ。

【請求項3】 前記1対の抗体固定化電極あるいは抗原固定化電極の面積が互いに異なるものである請求項1または2記載のイムノセンサ。

【請求項4】 さらに (C) 参照用電極を付設した請求項1、2または3記載のイムノセンサ。

【請求項5】 さらに (D) ガード電極を付設した請求項1、2、3または4記載のイムノセンサ。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、抗体抗原反応の有無、あるいは進行の程度を検知するための装置すなわちイムノセンサに関する。

【0002】

【従来技術】 抗体を用いた物質の検出法としては、抗体あるいは抗原をプラスチック等の固相に固定化し、抗原あるいは抗体を放射同位体や酵素で標識化する方法が広く知られており、例えば井上國世の総説に詳細が記されている（化学と生物、vol. 34、p240、1996）。さらに例えば特開平6-261784号公報、特開平7-159403号公報、Forensic science international, vol. 27, p49, 1985およびJournal of analytical toxicology, vol. 16, p211, 1992等で具体的な方法が提案されている。

【0003】 抗体抗原反応に伴う質量変化を測定する方法としてピエゾ素子を用いる方法（例えば特開平3-295443号公報やSensors and Actuators B, vol. 13-14, p188, 1993等）や光音響を用いる方法（例えば特開平3-29836号公報）あるいは弾性表面波を利用した方法（例えば特開平6-133759号公報）が提案されている。

【0004】 抗体抗原反応を光学的に測定する方法として表面プラズモン共鳴を用いた方法が例えば特開平1-224647号公報、特開平2-103469号公報、特開平2-297053号公報等で提案されている。

【0005】 抗体抗原反応を電気変化として測定する方法としては、抗体あるいは抗原を固定化した膜の膜電位

2

差を測定する方法（例えばJournal of Membrane Science, vol. 7, p1, 1980やAnalytica Chimica Acta, vol. 274, p59, 1993等）、抗体あるいは抗原を固定化した電極の電極電位差を測定する方法（例えば特公昭59-37462やClin. Chem., 26, p1569, 1980等）、ゲート部分に抗体あるいは抗原を固定化したイオン感受性電解効果型トランジスタを用いる方法（例えば特開平1-119753号公報や特公平3-26345号公報）等も提案されている。

【0006】 抗体あるいは抗原を固定化した電極を用いて、抗体あるいは抗原を固定化した電極間に満たした純水の電気伝導度変化を測定する方法が、特表平6-823287号公報や平成5年度電気化学協会大会講演要旨集, vol. 60th, p214, 1993において提案されている。

【0007】 抗原あるいは抗体を放射同位体や酵素で標識化したものを使う方法は、抗体抗原反応後に洗浄したのちに放射活性や酵素活性を測定するため、操作が煩雑であり、測定に時間がかかる。さらに分子量の小さい抗原（ハプテン）の測定は、競合法によるため高感度測定が期待できない。

【0008】 ビエゾ素子、光音響、弾性表面波あるいは表面プラズモン共鳴を利用した方法は、測定装置が大型かつ高価なため汎用方法とは成り得ない。また従来の抗体抗原反応を電氣的変化として測定する方法は、多くの方法が提案されているものの測定感度や操作性に問題があり、いまだ実用化されていない。

【0009】 電気伝導度変化を測定する方法として提案されている特表平6-823287号公報の記載内容を詳細に検討すると、極面積0.785 cm<sup>2</sup>、極間0.05 cmの電極セルで測られた純水の電気伝導度は65  $\mu$ S/cmであり、通常の純水の概念である1  $\mu$ S/cm以下とは大きく異なる。

【0010】 さらにこの公報に記載の極面積0.785 cm<sup>2</sup>、極間0.05 cmの電極セルを用いて通常の純水の概念である1  $\mu$ S/cm以下を測定するには、対向した抗体固定化電極間の距離を約8  $\mu$ mにする必要があると算出されるが、極面積0.785 cm<sup>2</sup>で電極間の距離が約8  $\mu$ mの電極セルの作成が極めて困難であることは容易に推定できる。このように特表平6-823287号公報において提案されている方法は、記載事項に誤りがあるか、あるいは実現性に乏しいものと言わざるを得ない。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、抗体抗原反応を抗体固定化電極上あるいは抗原固定化電極上で行わせ、その反応の有無あるいは進行の程度を抗体抗原反応に伴う抗体固定化電極間のあるいは抗原固定化

電極間の電気的性質の変化として測定できる、安価で操作が簡単なイムノセンサを提供する点にある。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、抗体抗原反応に伴う抗体あるいは抗原固定化電極間の電気的性質の変化を汎用の測定器で測定することにより、抗体抗原反応を測定する安価で単純な方法を提供することを目的として多くの実験を行った。

【0013】その結果抗体あるいは抗原を表面に固定化した2枚の抗体固定化電極あるいは抗原固定化電極を用いて、抗体抗原反応に伴う当該抗体固定化電極あるいは抗原固定化電極間の電気的性質の変化が測定可能であることを見いだした。さらにその場合において、抗体固定化電極あるいは抗原固定化電極の面積を互いに異ならせることにより、抗体固定化電極間あるいは抗原固定化電極間の電気的性質の変化が大きくなることおよびこの電気的性質の変化には抗体固定化電極間あるいは抗原固定化電極間を電気的に結合させる抗体あるいは抗原含有層が必要であることを見出し、本発明に至った。

【0014】本発明は、(A)表面に抗体あるいは抗原を固定した1対の抗体固定化電極あるいは抗原固定化電極を有し、該抗体固定化電極あるいは抗原固定化電極の間には抗体あるいは抗原を含むタンパク質層によって電気的に結合している電極部および(B)これら電極間の電気的性質を測定する計測器から構成されていることを特徴とするイムノセンサに関する。

【0015】本発明のイムノセンサを用いるにあたっては、測定対象物が抗原である場合は、前記電極部は2枚の抗体固定化電極を、逆に測定対象物が抗体である場合は、前記電極部は2枚の抗原固定化電極を各々使用する。

【0016】測定対象物が抗原であり、前記電極部が2枚の抗体固定化電極である場合、抗体は測定対象物である抗原を特異的に認識する性質を有していれば、モノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体のいずれもが利用可能である。しかし、検出感度や抗体の性質の安定性を考慮すれば、モノクローナル抗体の方がポリクローナル抗体より優れていることは、言うまでもない。

【0017】抗体あるいは抗原を固定化する電極の材質は電極部の電気的性質の変化を検出可能なものであればどのようなものでも利用が可能であり、例えば金、銀、銅、白金、ニッケル、スズ等の金属や酸化亜鉛等の酸化金属、あるいは導電性の各種合成樹脂等を挙げることができる。

【0018】抗体あるいは抗原を電極表面に固定する方法としては、電気化学法—応用測定マニュアル(逢坂、小山編、講談社サイエンティフィック、1991年)に記載されているように、例えば吸着による固定化や電極表面への化学的結合法等を挙げることができる。さらに、このうち電極表面への化学的結合法の具体的な方法

としては、特表平6-823287号公報や平成5年度電気化学協会大会講演要旨集(vol. 60th, p214, 1993)に記載されているδ-アミノプロピルトリエトキシシラン等のシランカップリング剤を用いて電極表面に導入したアミノ基等の官能基にグルタルアルデヒド等の架橋剤によって抗体あるいは抗原を結合させる方法を挙げることができる。

【0019】電極表面に導入したアミノ基やカルボキシル基等の官能基に抗体あるいは抗原を結合させるための架橋剤としては、グルタルアルデヒドの他に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、ジメチルホルムアミド、マレイミドベンゾイルオキシサクシニミド等を挙げることができる。

【0020】本発明に用いる電極部を構成する1対の抗体固定化電極あるいは抗原固定化電極は、互いの面積が異なることにより測定感度が向上する性質を有する。特表平6-823287号公報で提案されている方法においては、感度を高めるために抗体固定化電極の面積を大きくする工夫が種々提案されているが、電極部を構成する2枚の抗体固定化電極の1方を大きくしたりあるいは小さくしたりするという技術思想は見られない。

【0021】本発明者らは細い電極を1枚の基板上に並行に配置した櫛形電極部を用いて、抗体固定化電極あるいは抗原固定化電極の対となる2枚の電極の面積比と検出感度について検討を行った。その結果、対となる2枚の抗体あるいは抗原固定化電極の面積比が1より異なるほど検出感度が向上することを見いだしている。

【0022】勿論、本発明においても1対の電極のうち的一方はその電極面積が大きい方が好ましい。そのためには特表平6-823287号公報記載の櫛型電極やラセン型電極という概念を応用することができる。

【0023】本発明に用いる電極部は、抗体固定化電極あるいは抗原固定化電極の間が抗体あるいは抗原を含むタンパク質によって電気的に結合していることが重要である。特表平6-823287号公報で提案されている方法においては抗体は電極上に固定することについては記載されているが、電極間に前記抗体あるいは抗原を含むタンパク質層を介在させるという技術思想については何の示唆もない。前記抗体あるいは抗原を含むタンパク質層は、その導電率が $10^{-4}$  S/cm以下であり、好ましくは $10^{-7}$  S/cm以上である。とくに好ましい導電率の範囲は $10^{-3} \sim 10^{-6}$  S/cmである。

【0024】本発明においては、抗体固定化電極あるいは抗原固定化電極の1対のみを有する電極部を用いて抗体抗原反応を検出する場合には、抗体抗原反応の前と後で電極間の電気的変化をそれぞれ測定する必要があり、2回の測定作業が不可欠である。ところが、電極部に抗体あるいは抗原を固定化していない参照用電極を組み入れると、抗体抗原反応の測定を1回ですますことができる。

10

20

30

40

50

【0025】抗体あるいは抗原を固定化しない参照用電極の作成は、参照用電極表面をテフロンテープ等を用いて物理的にマスキングすることにより、抗体あるいは抗原の固定化反応が及ばないようにすることによって容易に行うことが可能である。

【0026】さらに本発明に用いる電極部にガード電極を組み入れることにより、電気的なノイズを除き、より感度を向上させることもできる。

【0027】本発明の電極部の電気的変化を測定する計測器の具体的な例としては、汎用の電気伝導度計を挙げることができる。しかし電気伝導度は溶液の抵抗値の逆数であり、さらに抵抗値は電流値と電圧値の関数であるので、計測器は電極間の抵抗値や電流値あるいは電圧値等を測定することのできるものであればいかなる計測器でも良いことは言うまでもない。

【0028】本発明のイムノセンサはメタンフェタミンの検出方法に極めて有用である。

【0029】覚醒剤に関連する事件の増加にともない、メタンフェタミンの使用者を簡便、迅速かつ正確に認知する必要性が高まり、簡便かつ高感度、高選択的にメタンフェタミンを測定する方法及び測定キットが望まれている。

【0030】現在、メタンフェタミンを特異的に認識するモノクローナル抗体を用いた測定システムは、酵素免疫測定法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay法; ELISA法)を基本にした競合法によるものが提案されている。しかしこの方法では、結果の判定に分光光度計などの特殊な科学機器が必要であり、また操作が複雑なことから使用者には特殊な技術を要求される。

【0031】また、現在提案されているモノクローナル抗体を用いた測定キットはキットの構成要素である固定化抗原がメタンフェタミンであるため、製造、販売において法律の規制を受ける。特開平7-63755号公報および特開平7-159403号公報においては、キットの構成要素としてメタンフェタミンの代わりに擬似抗原としてN-メチルフェネチルアミン等を用いる方法が提案されている。本発明のイムノセンサはこれらのメタンフェタミンやN-メチルフェネチルアミンなどの検出に有効に利用できる。

【0032】本発明で用いる抗体としては、抗メタンフェタミン抗体であればいかなる抗体でも使用することができる。具体的には、例えば特開平1-96198号公報や特開平6-261784号公報に記載されている、動物に免疫して得られた細胞株を培養することによって得られたメタンフェタミンに対して非常に高い特異的な反応性を示すモノクローナル抗体を挙げることができる。

【0033】

【実施例】以下に、実施例を挙げて本発明を具体的に説

明するが、本発明はこれにより限定されるものではない。

【0034】実施例1-1: 免疫用抗原の調製

(1) N-メチル-N-(4-アミノブチル)メタンフェタミンの合成

メタンフェタミンを適当なタンパク質に結合させるために、例えばChengらの方法〔FEBS LETTERS 36, 339 (1973)〕、Iwasakiらの方法〔日法医誌41 (3)、217 (1987)〕に準じ、N-メチルフェネチルアミンにアミノ基の導入を行った。すなわち、400mgのメタンフェタミンを40mlの脱水したベンゼンに溶解し、2.3gのN-(4-ブプロモブチル)フタルイミドと0.9gの炭酸ナトリウムを添加して、窒素ガス存在下で80℃、40時間還流した。次に、炭酸ナトリウムを濾過により除去し、等量の1MのHClを加え、更に等量のベンゼンで3回抽出した。水層に等量のクロロホルムを加え、3回抽出した。得られたクロロホルム層を合し、脱水後、濃縮した。この操作により、N-メチル-N-ブチルフタルイミド-メタンフェタミンが得られた。

【0035】得られたN-メチル-N-ブチルフタルイミド-メタンフェタミンに10mlのエタノールと0.1mlの90%の抱水ヒドラジンを添加して窒素ガス存在下で2時間、80℃で反応させた。反応終了後、エタノールを留去し1Nの塩酸を20ml添加した。この水溶液を等量のクロロホルムを用いて3回抽出し、水層に2Nの水酸化ナトリウムを滴下してpH10に調整した。この水溶液を等量のクロロホルムを用いて3回抽出し、クロロホルム層を合し脱水後、濃縮した。このようにして、1.27mgのN-メチル-N-(4-アミノブチル)メタンフェタミンを得た。また、マススペクトル、核磁気共鳴分析機を用いて、このN-メチル-N-(4-アミノブチル)メタンフェタミンの構造を確認した。

【0036】(2) N-メチル-N-(4-アミノブチル)メタンフェタミン-ウシ血清アルブミン複合体の調製  
免疫用抗原の合成は上記のN-メチル-N-(4-アミノブチル)メタンフェタミンを用いて行った。すなわち6mgのN-メチル-N-(4-アミノブチル)メタンフェタミンを1mlの脱イオン水に溶解後、6mgのウシ血清アルブミンを添加し、更に20mgの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドを添加し、HClにて反応液のpHを8に合わせた。反応は室温で16時間攪拌しながら行った。反応終了後、全反応液を生理食塩水を含むリン酸緩衝液(pH7.4)に対して透析し、未反応の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドとN-メチル-N-(4-アミノブチル)メタンフェタミンを除き、N-メチル-N-(4-アミノブチル)メタンフェタミン

ン-ウシ血清アルブミン複合体を得た。このN-メチル-N-(4-アミノブチル)メタンフェタミン-ウシ血清アルブミン複合体をマウスの免疫用抗原として用いた。

【0037】実施例1-2:メタンフェタミンに特異的に反応するモノクローナル抗体の検索

実施例1-1で合成したN-メチル-N-(4-アミノブチル)メタンフェタミン-ウシ血清アルブミン複合体を免疫用抗原として、6カ月間にわたりマウスに接種した。定法にしたがってマウス脾臓細胞を取りだし、ミエローマ細胞(SP2/0-Ag14株)と細胞融合してハイブリドーマ細胞を得た。クローニングを行った後、各細胞の培養上清液を用いてメタンフェタミンに特異的に反応するモノクローナル抗体の検索を行った。

【0038】メタンフェタミンに特異的に反応するモノクローナル抗体の検索は、免疫用抗原を固定化した96ウェルマイクロプレートを用いて、メタンフェタミン、エフェドリン、メチルエフェドリン等による競争阻害を指標として行った。メタンフェタミンでのみ強く阻害される抗体としてハイブリドーマ細胞8C1株の生産する抗体を選択した。この点については本発明者らの出願にかかる特願平6-232314号明細書に記述されている。

【0039】実施例1-3:ハイブリドーマ細胞8C1株(寄託番号FERM P-13148)の生産するモノクローナル抗体の精製

8C1株の培養上清液400mlに45%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、抗体を含むタンパク質画分を不溶体として得た。15000rpm、30分の遠心分離にて抗体を含むタンパク質画分を培養上清液から分離した。抗体を含むタンパク質画分はpH8のリン酸緩衝液に再溶解し、プロテインGをリガンドとしたアフィニティークロマトに供した。一連の操作によりモノクローナル抗体を26mg得た。

【0040】実施例1-4:ハイブリドーマ細胞8C1株(寄託番号FERM P-13148)の生産するモノクローナル抗体の反応特異性の検討

メタンフェタミン-ウシ血清アルブミン複合体を担持させた担体(酵素免疫測定法用96穴プレート)の各ウェルに実施例1-3で得た8C1株の生産するモノクローナル抗体26mg/mlと各種アミン類0.1mg/mlの混合物を0.1ml分注し、30分間室温で静置した。次に各ウェルの内容物を捨て脱イオン水で1回洗浄し、西洋ワサビパーオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリンG抗体溶液をウェル当り0.1ml分注し、さらに30分間室温で静置した。30分後各ウェルの内容物を捨て脱イオン水で1回洗浄し、西洋ワサビパーオキシダーゼ用の発色基質溶液(ABTS溶液)をウェル当り0.1ml分注し、室温で2分間反応させた。2分後1Nの硫酸をウェル当り10ml添加することにより反

応を停止し、マイクロプレートリーダーで415nmの吸収を測定した。

【0041】結果は図1に示した。アミン類を添加していないウェルの値を1として1/3以下の発色しか与えなかったアミン類としてメタンフェタミンとN-メチルフェネチルアミンが選択され、メタンフェタミンに特異的に反応するモノクローナル抗体がN-メチルフェネチルアミンをも認識できることが明らかとなった。

【0042】実施例1-5:抗メタンフェタミン抗体8C1を用いた抗体固定化電極(櫛形)の作成

(1)電極表面へのアミノ基の導入

図2に示すように縦50mm、横40mmのガラスエポキシ(ガラス繊維にエポキシ樹脂を含浸して作ったFRP)基板上に、銅めっきをし、ついで金めっきをした後、エッチングにより極幅1mmの金メッキ銅箔電極を縦に20本形成し電極基板を作成した〔図3(a)参照〕。電極基板はアセトン、クロロホルムおよびテトラヒドロフランにより表面の脂溶性の汚れを洗浄し、乾燥後0.1NのHClに5分間浸漬して表面を酸化させた。表面を酸化させた電極は、 $\delta$ -アミノプロピルトリエトキシシランの2wt%アセトン溶液に浸漬後、120°C、18時間の加熱処理をして表面にアミノ基を導入した〔図3(b)参照〕。

【0043】(2)電極表面および電極と電極間のFRP表面

実施例1-3で精製したモノクローナル抗体8C1を100mg/mlになるように調整した。この溶液にグルタルアルデヒドを0.1mg/mlになるように添加し、実施例1-5の(1)で作成した電極(アミノ基導入済み)基板を浸漬し、30°Cで時々緩く攪拌させながら4時間反応させて、前記抗体を電極表面およびFRP表面へ固定化した〔図3(c)参照〕。

【0044】(3)ブロッキング処理

電極表面へのタンパク質等の非特異的吸着を防ぐため、前項(2)で処理されたFRP基板を1wt%の牛血清アルブミン溶液に18時間浸漬し、電極間のFRP表面に固着しているモノクローナル抗体8C1間に牛血清アルブミンを固着させた。これにより電極と電極の間に抗体含有タンパク質層が形成できた〔図3(d)参照〕。

【0045】実施例1-6:感度に及ぼす対となる2枚の抗体固定化電極の面積比の検討

実施例1-5で製作した櫛形抗体固定化電極を用いて、感度に及ぼす極面積の影響を検討した。まず、①前記櫛形抗体固定化電極と同型の抗体固定化処理を全く行っていない電極部(アミノ基導入、モノクローナル抗体処理、ブロッキング処理のいずれをも行っていないもの)を用いて、純水の導電率(バックグラウンド値)を測定した。②20本の各電極間は電気的に導通していることを確認後、櫛形抗体固定化電極を用いて、20本の各電極の隣り合う2本の電極間の純水の導電率をそれぞれ測定

し、抗体抗原反応前の導電率を求めた。③次に抗原としてN-メチルフェニルアミン10 $\mu$ g/mlを用いて抗体抗原反応を行わせ、再度20本の各電極の隣り合う2本の電極間の純水の導電率をそれぞれ測定し、抗体抗原反応後の導電率を求めた。④そして、変化率を下記式により算出した

$$[\text{数1}] \text{変化率}(\%) = \{(c/a - b/a) \div b/a\} \times 100$$

a: バックグラウンド値 (mV)

b: 抗原抗体反応前の導電率 (mV)

c: 抗原抗体反応後の導電率 (mV)

【0046】10V、80Hzでの測定結果を図4に示した。抗体抗原反応の前後での純水の導電率の変化率は、基板の端の電極間で測定するほど高い値を示し、基板の真ん中に位置する電極間では、相対的に低い値を示した。

【0047】すなわち、本発明においては図2のNo. 1の電極からNo. 2の電極までのすべての電極間には、図3(d)にみられようにモノクローナル抗体8C1と牛血清アルブミンよりなる抗体含有タンパク質層が形成されており、この層は電極間を短絡させるほどの導電性は示さないが、例えば、No. 1の電極とNo. 2の電極との間に電圧を印加すると、図4のデータに示すとおり、最大の感度(変化率%)を示す。この理由は、No. 2の電極より右の部分すなわち、No. 2電極、No. 2とNo. 3の電極間の抗体含有タンパク質層、No. 3電極、No. 3電極とNo. 4電極間の抗体含有タンパク質層、……、No. 19とNo. 20の電極間の抗体含有タンパク質層、No. 20の電極が一体化された形に近い現象があらわれ、あたかもNo. 2の電極～No. 20の電極部分が一枚の電極であるかのように働いているためと考えられる。このケースの場合No. 1電極の面積を1とするとNo. 2電極サイドの面積は37倍の面積をもった電極と似た状態といえることができる。

【0048】これに対して、No. 9とNo. 10の電極に電圧を印加した場合は、No. 9の電極側は、No. 1の電極からNo. 9の電極までの部分が1つの電極的な働きを示し、No. 10の電極側は、No. 10の電極からNo. 20の電極までの部分が1つの電極的な働きを示すもので、両者の面積比はかなり1に近いものになる。そのためNo. 1とNo. 2の電極に電圧を印加した場合に較べて検出感度が低下するのは図4のデータが示すとおりである。

【0049】図5には、図2におけるNo. 1～No. 20の電極を、抗体を固定化していない電極に代えた場合は図2と同様の装置を用いた場合の測定結果を示した。抗体を固定化していない電極と抗体を固定化した電極での測定値との比較すなわち、図4と図5との比較から抗体抗原反応の前後での純水の導電率の変化が、抗体

抗原反応に起因するものであることを証明している。

【0050】実施例1-7: 参照用電極およびガード電極を有する抗体固定化電極部の作成

(1) 抗体固定化電極、参照用電極およびガード電極を有する抗体固定化電極部表面へのアミノ基の導入

図6に示したように、縦66mm、横21mmのガラスエポキシ基板10上の中央に、実施例1-5(1)と同様にしてエッチングにより極幅1mmの金メッキ銅箔電極1、2、3を縦に3本形成し、さらにガード電極4として極幅1mmの金メッキ銅箔電極を周囲に配置し、ついで図6において左下り斜線で表示した部分にエポキシ樹脂よりなるレジスト層5を印刷して電極基板を作成した。電極基板はアセトン、クロロホルムおよびテトラヒドロフランにより表面の脂溶性の汚れを洗浄し、乾燥後0.1NのHClに5分間浸漬して表面を酸化させた。ついで、図6において右下り斜線で表示した部分にテフロン(商品名)テープを張ってマスキングした後、前記表面を酸化させた電極を、 $\delta$ -アミノプロピルトリエトキシシランの2%アセトン溶液に浸漬後、120℃、18時間の加熱処理をして電極表面にアミノ基を導入した。

【0051】(2) 電極表面への抗体の固定化

実施例1-3で精製したモノクローナル抗体8C1を100mg/mlになるように調整した。この溶液にグルタルアルデヒドを0.1mg/mlになるように添加し、実施例1-7の(1)で作成した電極(アミノ基導入済み)基板を浸漬し、30℃で時々緩く攪拌させながら4時間反応させて、前記抗体を電極表面およびレジストされていないFRP表面すなわち領域6へ固定化した。

【0052】(3) ブロッキング処理

電極表面へのタンパク質等の非特異的吸着を防ぐため、前項(1)で処理されたFRP基板を1wt%の牛血清アルブミン溶液に18時間浸漬し、電極間のFRP表面に固着しているモノクローナル抗体8C1間に牛血清アルブミンを固着させた。これにより電極1と電極2およびその間の所定個所すなわち領域6に抗体含有タンパク質層が形成できた。これにより電極1および2は抗体固定化電極となった。前記右下り斜線で表示した部分が本実施例における電極部として作用する。この部分の電極1と電極2は抗体固定化電極1および2となり、そのうち抗体固定化電極2は基準電極2として使用する。基準電極2(すなわち抗体固定化電極2)と抗体固定化電極1との間は抗体含有タンパク質層が形成されている。

【0053】実施例1-8: 感度に及ぼす2枚の抗体固定化電極間に存在する抗体含有層の影響の検討

実施例1-7で製作した抗体固定化電極1および2、参照用電極3、ガード電極4を有する抗体固定化電極部を用いて、感度を得るために必要な抗体固定化電極の構造について検討を行った。抗体固定化電極の各電極上の固



定化抗体あるいは各電極間の抗体含有層をそれぞれへらを用いて物理的に削除し、10V、80Hzでの純水中で基準電極（抗体固定化電極2を基準電極とした）と抗体固定化電極1との間の電気伝導度をセル定数を1と仮定した場合の電位として測定した。

【0054】結果は図7に示した。基準電極2と抗体固定化電極1との間の抗体含有タンパク質層を削除すると電位は極端に小さい値となり、感度を得るためには、基準電極2と抗体固定化電極1間の抗体含有タンパク質層が不可欠であることが明らかとなった。

【0055】実施例2：電極部に参照用電極およびガード電極を有するイムノセンサを用いたN-メチルフェネチルアミンの検出

実施例1-7で製作した抗体固定化電極1および2、参照用電極3、ガード電極4を有する抗体固定化電極部を用いて、モノクローナル抗体8C1がメタンフェタミンと同様に反応するN-メチルフェネチルアミンの検出を行った。最初に基準電極2と抗体固定化電極1との電極間の純水の導電率をそれぞれ測定した。次にN-メチルフェネチルアミン1 $\mu$ g/mlおよび10 $\mu$ g/mlを用いて抗体抗原反応を5分間行わせ、基準電極2と抗体固定化電極1との電極間の純水の導電率をそれぞれ測定した。各値は表面処理をしていない同じデザインの電極を用いて測定した純水の導電率（バックグラウンド値）に対する比率とし、さらに抗体抗原反応の前後での純水の導電率の変化率として算出した。

【0056】10V、80Hzでの測定結果を図8に示した。なお、N-メチルフェネチルアミンの同一濃度で黒点が2つあるのは同じ実験を2度行ったためである。本発明のイムノセンサは、N-メチルフェネチルアミンを1 $\mu$ g/mlおよび10 $\mu$ g/mlといった低濃度でも正確に検出することが可能であり、変化率はN-メチルフェネチルアミンの濃度に依存して高い値を示した。

【0057】

【効果】抗体抗原反応に伴う抗体固定化電極間のあるいは抗原固定化電極間の電気的変化を、汎用の計測器を利用して測定することにより、抗体抗原反応を検出する安価で単純な方法を提供することができる。また本発明は、放射性や酵素活性を測定する手段を用いないため測定時間の短縮が図れるばかりではなく、競合法を用い

り、高感度測定が実現できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】ハイブリドーマ細胞8C1の生産するモノクローナル抗体を用いた場合の各種表示試薬の反応特性（反応選択性）をそれぞれ反応液の415nm吸光度の相对比较により示すグラフである。

【図2】実施例1で用いる櫛形抗体固定化電極を設けたFRP基板の平面図である。

【図3】FRP基板の所定個所に銅-金層を形成してなる電極と、FRP基板上に、抗体を固定化する工程を説明するための部分断面図であり、（a）はFRP基板上に銅-金よりなる電極が形成されている状態を示し、

（b）は電極面上にアミノ基が導入された状態を示し、

（c）は前記アミノ基にはグルタルアルデヒドを介してモノクローナル抗体が結合し、FRP基板表面にはモノクローナル抗体が結合している状態を示し、（d）はFRP基板表面のモノクローナル抗体間に牛血清アルブミン（BSA）が固着している状態を、それぞれモデル的に示す。

【図4】実施例1-6で行った対となる抗体固定化電極の面積のちがい（面積比）が、測定感度にどのような影響を与えたかを示すグラフである。

【図5】図4の場合の抗体固定化電極の代りに抗体を固定化していないただの電極を用いた場合の測定感度を示すグラフである。

【図6】実施例1-7にかかる電極部の構造を示す平面図である。

【図7】抗体を含有する導電体層の有無による測定感度への影響を示すグラフである。

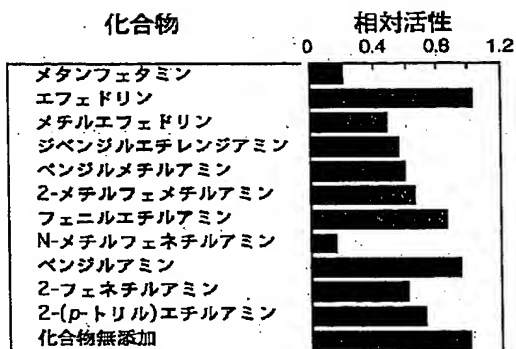
【図8】実施例2において、N-メチルフェネチルアミンの各濃度における検知のしやすさを示すグラフである。

【符号の説明】

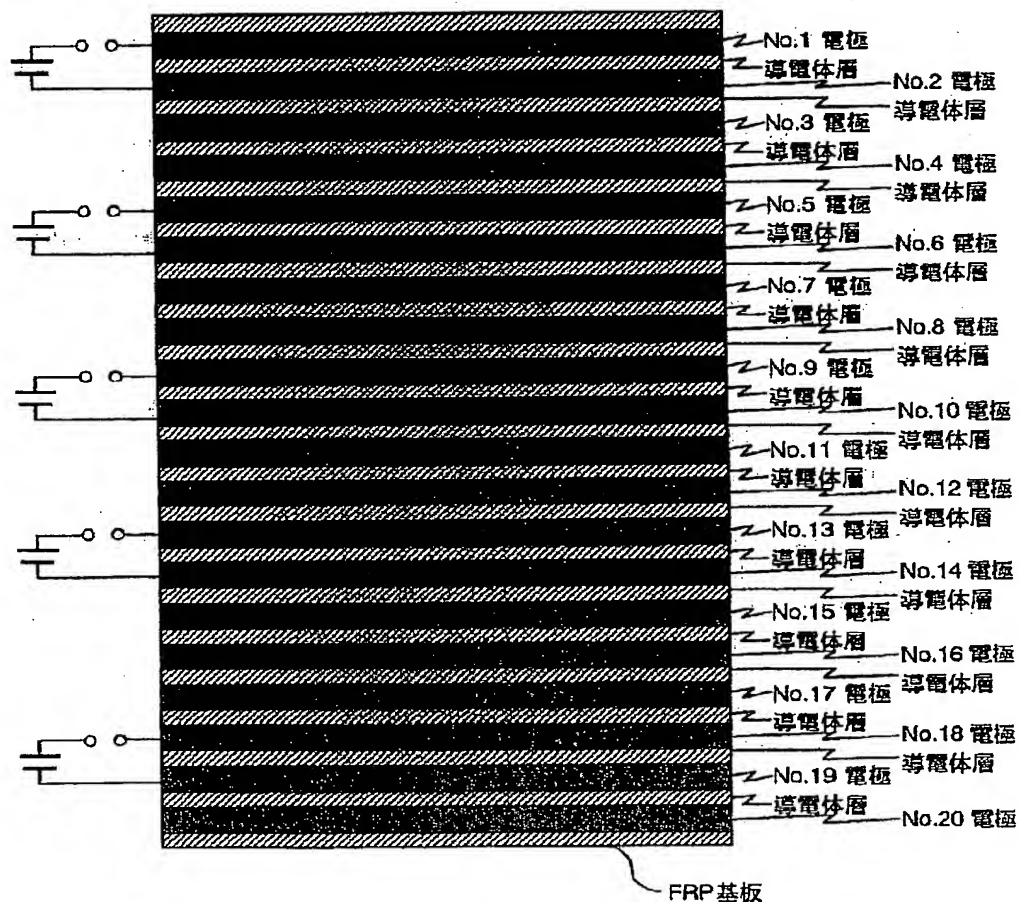
- 1 電極（右下り斜線部分のみが抗体固定化電極）
- 2 電極（右下り斜線部分のみが抗体固定化電極）（基準電極）
- 3 参照用電極
- 4 ガード電極
- 5 レジスト層
- 6 抗体固定化処理を施された領域
- 10 FRP基板



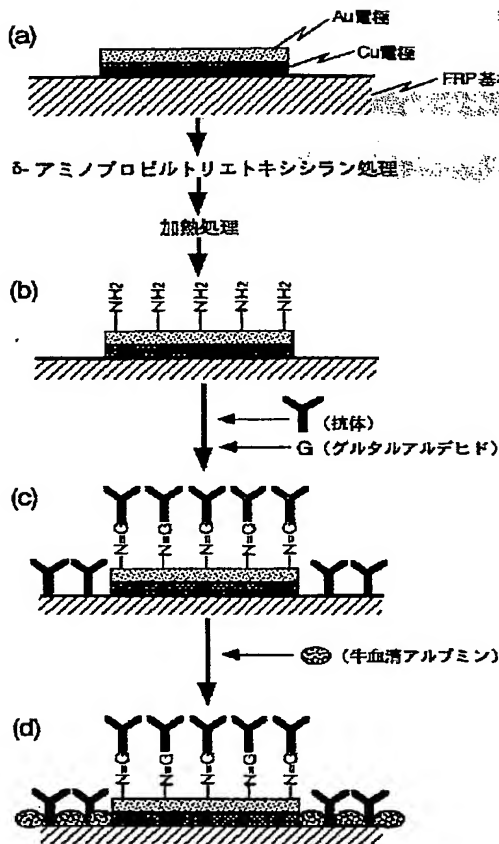
【図1】



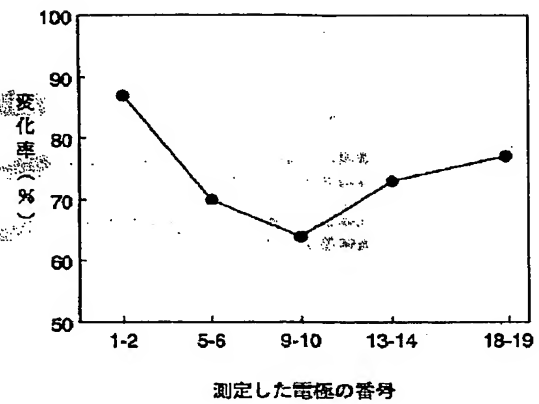
【図2】



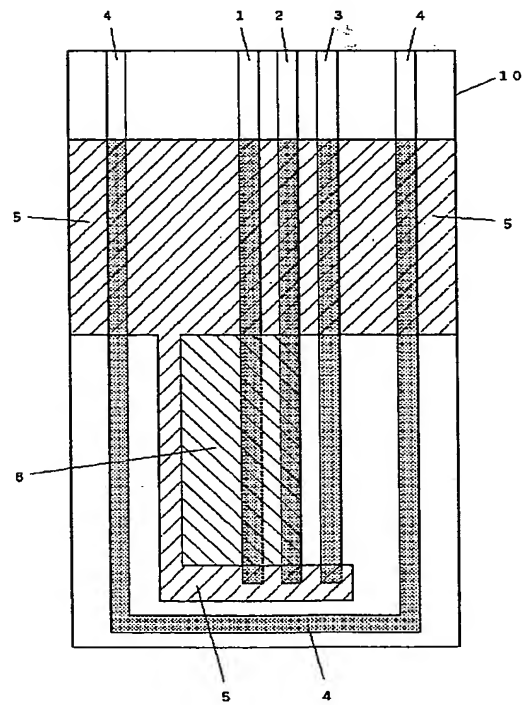
【図3】



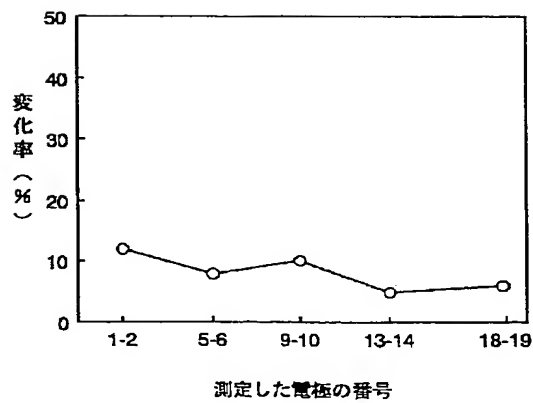
【図4】



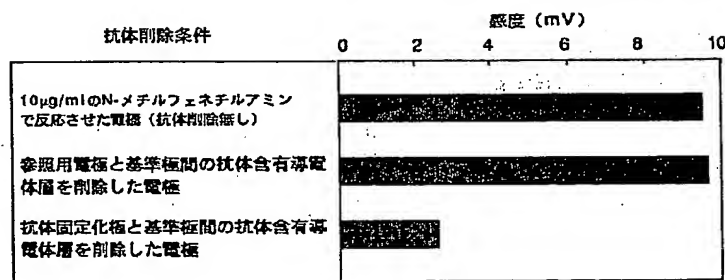
【図6】



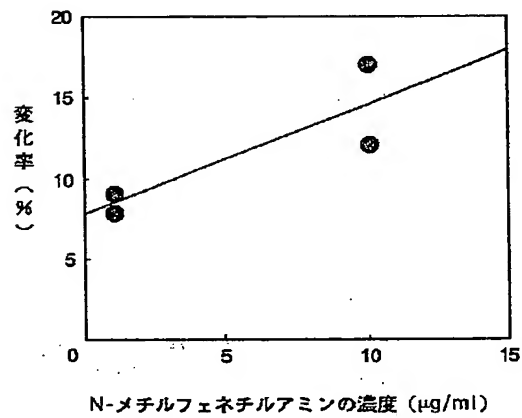
【図5】



【図7】



【図8】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ ~~FADED TEXT OR DRAWING~~
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ ~~GRAY SCALE DOCUMENTS~~
- ☒ ~~LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT~~
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**